

**ELTÉRŐEN HŐKEZELT JUHTEJ ÉS JUHTEJBŐL KÉSZÜLT TERMÉK D-AMINOSAV
TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA**
**EXAMINATION OF THE D-AMINO-ACID CONTENT OF SHEEP MILK BY DIFFERENT
HEAT-TREATING AND PRODUCTS FROM SHEEP MILK**

CSANÁDI J*.; FENYVESSY J*.; JÁVOR A.**

SZTE Szegedi Élelmiszeripari Főiskolai Kar (University of Szeged, College Faculty of
Food Engineering), H-6724 Szeged, Mars tér 7., Hungary

Debreceni Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar (University of Debrecen, Faculty
of Agricultural Sciences). H- Debrecen, Böszörményi út 138., Hungary

ABSTRACT

Milk and dairy products provide very good examples of the occurrence of D-amino acids in the processing of raw foods. Although a consensus has not been reached on D-amino acids, at present their negative consequences outnumber their positive effects. Many have studied the presence of D-amino acids in milk and dairy products. However, we have found no research concerning the milk of small ruminants. We have therefore studied the D-amino acid content of ewe's milk, ewe's milk heat-treated at various temperatures and various products of ewe's milk.

1. BEVEZETÉS - INTRODUCTION

A szervezetben található D-aminosavak legfontosabb forrásai az élelmiszerek, ugyanis az élelmiszer fehérjék a főzés vagy a különböző élelmiszeripari feldolgozási folyamatok során kisebb-nagyobb mértékű racemizáción esnek át. Az eddigi kutatások szerint elsősorban a közeg pH-ja, a hőkezelés, az alkalikus behatás ideje és az egyes aminosavak szerkezete befolyásolja leginkább a racemizációt. A D-aminosavak rontják a termék minőségét és a kezelt élelmiszer biztonságos felhasználhatóságát.

A D-aminosavak jelenléte a fehérjében csökkenti az emészthetőséget és befolyásolja a többi aminosav felhasználhatóságát. Ez az esszenciális aminosavak L-enantiomerjei mennyiségének csökkenését eredményezheti, mivel a peptid kötések a normális úton nem tudnak szétszakadni. Néhány D-aminosav izomer toxikus hatással is rendelkezhet és módosíthatják a lizinoalanin biológiai hatását is. Másrészt viszont, bizonyos D-aminosavak hasznosak is lehetnek (pl. fájdalomcsillapítás), és a csökkent emészthetőségű D-aminosavakat tartalmazó fehérjéket felhasználhatók pl. fogyókúráknál.

A tej és tejtermékek, mint alapélelmiszerek, igen jó példák az eredeti nyersanyag D/L-aminosav összetételének megváltozására. Bár a kereskedelemben (elsősorban külföldön) nyers tej (hőkezeletlen) is kapható, a legtöbb tejterméket először különböző módon pasztőrözik, majd homogénezik, de sűrítetik, alvaszthatják, stb., így megadva a konkrét termék jellegét, mint pl. a fogyasztói tej, a joghurt vagy a különböző sajtok. Ez utóbbi két tejterméket baktériumok segítségével fermentálják, amely eljárás szintén D-aminosavak keletkezését előidézti elő. A tejben és tejtermékekben lévő D-aminosavak előfordulását eddig többen vizsgálták és arra a következtetésre jutottak, hogy elsősorban a D-Aszparaginsav, D-Alanin, és D-Glutaminsav-tartalom lehet jelentős ezekben a termékekben. Mivel a tejtermékek gyártásakor (kivéve a Na-kazeinát) lúgos kezelést nem alkalmaznak, így

kijelenthetjük, hogy a tejtermékek esetében a hőkezelés és a bakteriális tevékenység idézi elő a D-aminosavak mennyiségének növekedését.

Több kutató vizsgálta a tej és különböző tejtermékek D-aminosav tartalmát és arra a következtetésre jutottak, hogy a technológia során jelentősen nőhet a D-aminosav tartalom.

A szabad aminosavak racemizációját tanulmányozva BADA (1985) és STEINBERG et al., (1984) megállapították, hogy 100 °C-on 7 és 8 pH között a szerin racemizációs felezési ideje (az az idő, amikor a D/L arány eléri a 0.33-at) 3 nap, az aszparaginsavé 30 nap, az alaniné 120 nap, az izoleuciné pedig 300 nap. LIARDON & LEDERMAN (1986) szerint pH=9-nél 83 °C-on kazein esetében az előbbi 4 aminosav racemizációs felezési ideje: 16 óra, 19 óra, 11 nap, és 57 nap.

PAYAN et al. (1985) a tejkezelés hatására bekövetkező változásokat a D-aszparaginsav koncentrációjának mérésével tanulmányozták. (A következőkben a D-aminosavak koncentrációját az összes aktuális aminosav %-ában adjuk meg: %D-aminosav= $(D/D+L) \cdot 100$). A nyers tej tartalmazta a legkevesebb (1,48%), D-aszparaginsavat, mennyisége pedig a kezelések növekvő számával együtt nőtt (acidofilusz tej: 2,05%, sovány tejpor: 2,15%, kefir: 2,44%, sűrített tej: 2,49%, joghurt: 3,12%, tejalapú csecsemőtápszer: 4,95%). Legnagyobb a D-aszparaginsav aránya a csecsemőtápszerekben, melyek olyan technológiai beavatkozásokon mennek keresztül mint pl. a porlasztva szárítás vagy a sterilizálás (hővel).

GANDOLFI et al. (1992) a hőkezelés és a baktériumok hatását vizsgálták a tej szabad és fehérjében kötött D-aminosav tartalmára. Megállapították, hogy a nyers tej szabad D-aminosav tartalma nem nőtt a pasztörözés, az ultrapasztorizálás vagy a sterilizálás hatására. A vizsgált tejminták szabad D-alanin tartalmát 3-8% közöttinek, D-aszparaginsav tartalmát 2-5% közöttinek, D-glutaminsav tartalmát pedig 2-4% közöttinek mérték. Ezzel szemben megállapították, hogy a nyers tejminták szabad D-aminosav tartalma jelentősen nőtt a 4 °C-on történő tárolás alatt, ezért a D-alanin tartalom kimutatását javasolták a tej bakteriális szennyezettségének ellenőrzésére.

PALLA et al. (1989) a tejpor szabad D-aszparaginsav tartalmát 4-5%, D-alanin tartalmát pedig 8-12% közöttinek találták. A joghurt szabad D-alanin tartalmát 64-68%-nak, szabad D-aszparaginsav tartalmát 20-32%-nak, szabad D-glutaminsav tartalmát pedig 53-56%-nak mérték. Ugyanezek az értékek érett sajt esetében 20-45%, 8-35% és 5-22% között alakultak. Az érett sajt szabad D-fenilalanin tartalmát 2-13% közöttinek találták, és egy minimális mennyiségű D-leucint is ki tudtak mutatni az érett sajtból. Méréseik alapján felhívják a figyelmet arra, hogy nem azok az élelmiszerek tartalmazzak sok D-aminosavat melyeket hosszabb ideig tartó hőkezelésnek tettek ki, hanem inkább azok, melyek mikrobiológiai fermentáción mentek keresztül.

BRUCKNER & HAUSCH (1990) a tej, a fermentált tej, a friss sajt és a túró szabad D-aminosavait vizsgálva megállapították, hogy jelentős mennyiségű D-aminosav fordul elő mind a nyers tejben mind a belőle készített erjesztett tejtermékekben.

CSAPÓ és munkatársai (1995b; 1997b; 1996-97) az egészséges és a masztitiszes tőgyből fejt tehéntej, illetve egyes sajtfélék szabad D-aminosav tartalmát vizsgálták.

Megállapították, hogy fejéskor mind az első tejsugarak, mind pedig a beteg tőgyből származó tej jelentős mennyiségben tartalmaz D-Asp-t, D-Glu-t, D-Ala-t és D-Ile-t. A felsorolt aminosavakon kívül a tőgygyulladásos tőgyből származó tejből még D-Ser-t, D-Pro-t, D-Val-t, D-Leu-t és D-Lys-t is ki tudtak mutatni. A D-aminosavak mennyisége és aránya a masztiteszt próba fokozatainak megfelelően nőtt a beteg tőgyből származó tejben. Pl. a D-alanin tartalom a negatív mintánál 12,6%, míg a négy keresztes mintánál 48,9 % volt, de más aminosavak esetében is jelentős változást tapasztaltak. Vizsgálataik bizonyítják, hogy a tehéntejből gyártott fogyasztói tejfélék D-aminosav tartalmának mértékében az első tejsugarak, illetve a szubklinikai masztitiszben szenvedő tehenek teje lényeges szerepet játszik (CSAPÓ et al., 1995b; 1995-96; 1997b).

Különböző technológiával készült sajtok szabad D-aminosav tartalmát vizsgálva megállapították, hogy a szabad D-aminosavak közül a D-Asp átlagosan 58 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (30,3%), a D-Glu 117 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (15,8%), a D-Ala pedig 276 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (37,2%) koncentrációban fordult elő a különböző sajtokban. A D-aminosavak mennyiségében jelentős volt a különbség az egyes sajtok között; a százalékos összetétel viszont a D-Asp esetében 13,9-46,3%, a D-Glu esetében 12,9-26,6%, a D-Ala esetében pedig 16,1-48,1% között változott. A három D-aminosavon kívül a többi D-aminosav csak nyomnyi koncentrációban, a kimutathatóság határán volt jelen a sajtokban. Nagyobb D-aminosav tartalmat mértek azoknál a cheddar sajtoknál, ahol *Lactobacillus*-okat is használtak az előállítás folyamán.

Kevesen vizsgálták (illetve a közlésekből nem egyértelmű) a kiskérődzők, így a juh tejét, a belőle készített termékek D-aminosav tartalmát, valamint a hőkezelés mértékének hatását a juhtej D-aminosav tartalmára. Cikkünkben ezzel kapcsolatos eredményeinkről számolunk be.

2. MÓDSZEREK- METHODS

2.1 Kísérleti körülmények - Circumstances of experiments

Kísérleteinkhez a juhtej hőkezelése és a fermentált készítmény (joghurt) előállítása az SZTE SZÉF tejipari műhelycsarnokában történt. A nyers juhtejet 60, 70, 80, 90, és 120 °C-on hőkezeltük. A joghurt előállításakor 75 °C-os pasztörözést, homogénezést és *Lactobacillus bulgaricus* - *Streptococcus thermophilus* kultúrát használtunk.

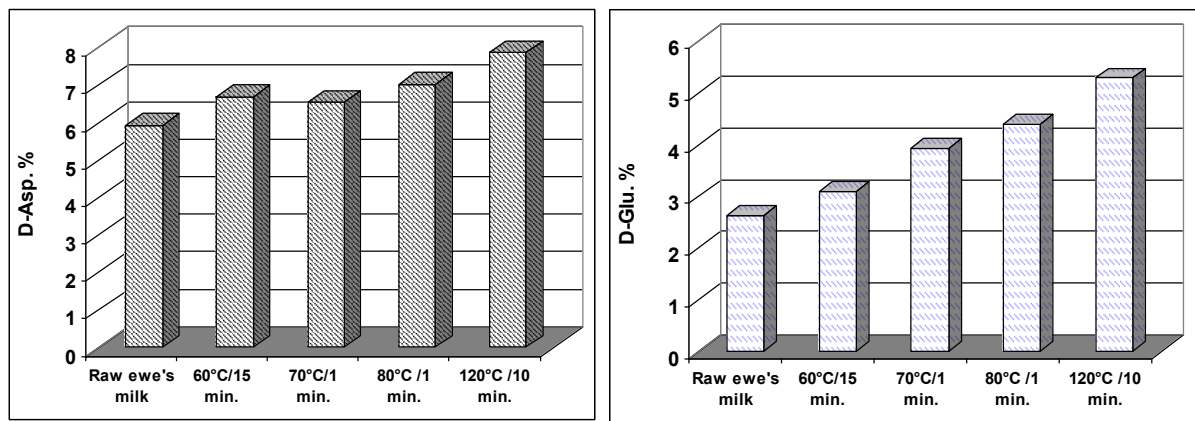
2.2. D-aminosavak meghatározása - Determination of D-amino acids

A liofilezett minták D-aminosav tartalmát a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karának Kémiai Intézetében, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával fluorenil-etil-klorofommáttal (CSAPÓ & EINARSSON, 1993) ill. o-ftálaldehid/tetra-O-acati- β -D-glükopiranozid (FOLESTAD et al., 1994) királis reagensekkel történő oszlop előtti származékképzéssel határoztuk meg. A fehérje hidrolízise során előforduló racemizáció kiküszöbölésére magas hőmérsékleten rövid ideig végzett hidrolízis alkalmaztunk.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK – RESULTS AND DISCUSSION

3.1. A hőkezelés hatása a D-aminosavakra – The influence of heat-treatment on D-amino acids

A D-aminosav tartalom hőkezelés hatására történő változását láthatjuk az 1. ábrán. Megállapítottuk, hogy a hőkezelés juhtej esetében is megnöveli a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav mennyiségét.



1. Ábra Nyers juhtej és eltérő hőmérsékleten hőkezelt juhtej D-aszparaginsav és D-glutaminsav tartalma (az összes D-aszparaginsav ill. D-Glutaminsav %-ában) (The D-asparagine and D-glutamine content of raw ewe's milk and ewe's milk heat-treated at various temperatures (all data for D-Asp and D-Glu in %))

Úgy tűnik azonban, hogy a két aminosav hőérzékenység eltérő. Az aszparaginsav esetében a 60 és 70°C-os hőkezelés közel azonos D-aminosav tartalom-növekedést idézett elő, majd 80°C-tól egyértelműen nőtt a D-aminosav tartalom. A D-glutaminsav tartalom növekedése viszont az emelkedő hőlépcsőkben szignifikáns és folyamatos volt.

Mindkét aminosav esetében a legnagyobb hőterhelés okozta a legmagasabb D-aminosav tartalmat. Az eltérő hőérzékenységet bizonyítja azonban az a tény, hogy a nyers tej esetében a D-aszparaginsav javára meglévő 3,3% különbség (a) a 120°C-os hőkezelés után 2,5%-ra csökkent.

Az adatok alapján kijelenthetjük, hogy önmagában a hőkezelés nem okoz döntő változást a juhtej D-aszparaginsav és D-glutaminsav tartalmában, az összes adott aminosav-tartalomhoz képest. (max.: 7,8% D-aszparaginsav, 5,3% D-glutaminsav)

Az egyes hőkezelések hatásának mértékét nyers tejhez képest mutatjuk be az 1. táblázatban.

Table 1.

1. táblázat

A különböző hőkezelési módok hatására bekövetkező D-aminosav tartalom növekedés mértéke % (Nyers juhtej értéke=100%) The growth rate (%) of D-amino acid content resulting from various heat treatments (Value of raw ewe's milk=100%)

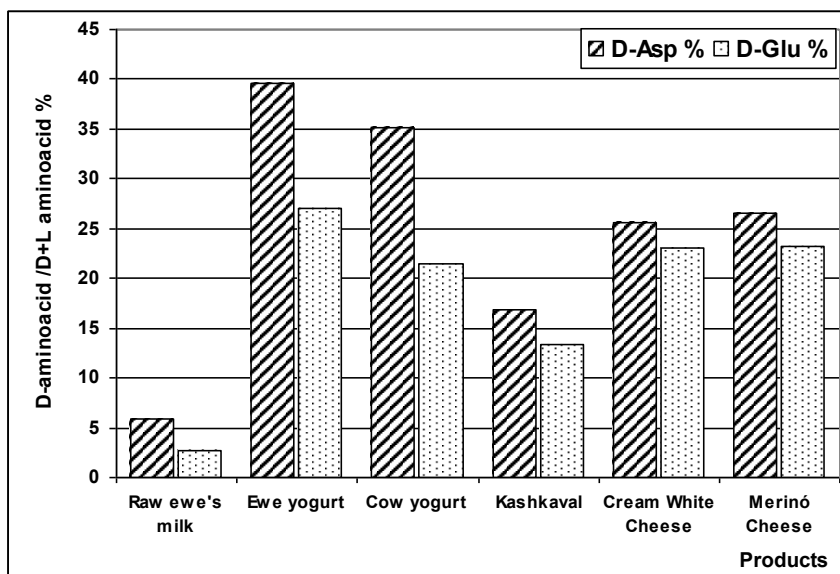
Aminosav (amino-acid)	Hőkezelés (Parametres of heat-treatments)			
	60°C 15 min	70°C 1 min	80°C 1 min	120°C 10 min
D-aszparaginsav	113,0	110,2	119,0	132,6
D-glutaminsav	117,8	149,9	167,5	201,9

A 60°C-os hőkezelés kb. egyforma változást eredményezett a két aminosavnál, ám 70°C-nál már lényegesen nagyobb arányú volt a növekedés a glutaminsav esetében. A 120°C-os hőkezelés (sterilizés) hatására a D-aszparaginsav tartalom 32%-al, míg a D-glutaminsav tartalom mintegy 102%-al nőtt (kb. duplázódott). A 70 és 80 °C-on végzett hőkezelés eredménye alapján elmondhatjuk, hogy 1 °C hőmérséklet-növekedés kb. 0,9% D-aszparaginsav és kb. 1,7% D-glutaminsav tartalom növekedést eredményez. Azonos mértékű hőmérséklet emelés okozta D-enantiomer keletkezés sebessége glutaminsav esetében kétszer akkora, mint az aszparaginsav esetében.

A táblázat adatai tehát bizonyítják, hogy hőkezeléskor a glutaminsav azonos körülmények között hajlamosabb a racemizációra. Esetében a D enantiomer keletkezése gyorsabb, nagyobb mértékű, mint az aszparaginsav esetében. A nyers tej magasabb D-aszparaginsav tartalma viszont azt sejteti, hogy a tőgyben uralkodó illetve a hűtő-tárolás során a tejbe került mikroflóra az aszparaginsavra van nagyobb hatással.

3.2. Juhtejből készült termékek vizsgálata (Investigation of products from ewe's milk)

Hagyományos érlelt juhsajt, gyúrt sajt (Kashkaval), ultraszűrővel készülő krémfehérsajt és savanyított termék (joghurt) D-aminosavtartalmának vizsgálati eredményeit mutatjuk be a 2. ábrán. Minden termékre elmondható, hogy lényegesen nagyobb arányban tartalmazza a D-enantiomereket, mint a nyers juhtej. Méréseink tehát megerősítik a szakirodalom azon közléseit, melyek szerint a kultúrákkal történő fermentálás nagymértékben növeli a D-aminosav tartalmat a tejtermékekben.



2. ábra A nyers juhtej és egyes tejtermékek D-aszparaginsav és D-glutaminsav tartalma (az összes D-aszparaginsav ill. D-Glutaminsav %-ában) The D-asparagine and D-glutamine content of raw ewe's milk and certain dairy products (all data for D-Asp and D-Glu in %)

A két aminosav közül, minden termék esetében, magasabb D-aszparaginsav tartalmat, illetve alacsonyabb D-glutaminsav tartalmat tapasztaltunk.

A klasszikus érlelt sajt (Merino) és a vegyes alvasztással készülő krémfehérsajt D-aminosav tartalma kb. azonos volt. A Kashkaval sajt alacsonyabb értékeit a meleg sólével történő mártáskor bekövetkező hőhatás, valamint a sajt kisebb vízaktivitása okozhatta.

Table 2. Egyes juhtejtermékek D-aminosav tartalma és aránya The content and percentage of D-amino acid in certain products of ewe's milk 2.táblázat

	D-Asp %	D-Glu %	D-Aszp./D-Glu.
Nyerstej (Raw milk)	5,92	2,62	2,26
Juhjoghurt (Yoghurt from ewe's milk)	39,53	27,05	1,46
Tehéntej jogh. (Yoghurt from cow's milk)	35,14	21,44	1,64
Kashkaval sajt (cheese)	16,80	13,34	1,26
Krémfehérsajt (Cream White cheese)	25,53	23,01	1,11
Merinó sajt (Merino cheese)	26,52	23,25	1,14

A joghurtfélék a sajtoknál lényegesen több D-aminosavat tartalmaztak. Ez a lényegesen nagyobb csíraszámából és az intenzívebb baktérium tevékenységből adódhat. Érdekes tapasztalat, hogy a 4,4 körüli pH értéket képviselő joghurtok esetében a D-aszp/D-glut arány lényegesen nagyobb, mint a sajtok esetében (sajtok: 1,11-1,26). Ez az arány juhtejből készült joghurt esetén 1,46. tehéntej joghurt esetén 1,64. További érdekesség, hogy a tehéntejből készült joghurt D-aszp/D-glut aránya

nagyobb, mint a juhtej joghurté, mivel azonban nem azonos körülmények között készült a két termék, jelenleg erre nem adható magyarázat.

Ugyanakkor a juhjoghurnak lényegesen nagyobb a D-aminosav tartalma, amit részben a juh elegytej, tehéntejhez képest jóval magasabb összes mikróbaszámával magyarázhatunk.

További levonható következtetés, hogy a nyers juhtej természetes, illetve szokásos mikroflórája idézi elő a legnagyobb D-aszp./D-glut. arányt, míg ez egyik juhtejből készült termék esetében sem ér el 1.5 értéket. Másként fogalmazva, a juhtejtermékek gyártásához használt néhány szokásos kultúra 1.1 és 1,5 közötti D-aszp./D-glut. arányt idéz elő.

ÖSSZEFOGLALÁS - SUMMARY

A tej és tejtermékek igen jó példája az élelmi nyersanyagok feldolgozása során keletkező D-aminosavak képződésének. Bár a D-aminosavak megítélése nem egyértelmű, jelenleg több hátrányos következményük ismert.

A D-aminosavak jelenlétét tehéntejben és tehéntejből készült termékekben sokan vizsgálták. A juhtejjel kapcsolatban azonban nem találunk közleményeket. Vizsgáltuk ezért a juhtej, az eltérő hőmérsékleten hőkezelt juhtej és néhány juhtejből készült termék D-aminosavtartalmát.

Eredményeink szerint a nyers juhtej, a tehéntejhez hasonlóan, nem rendelkezik magas D-aszparaginsav (5,92%) és D-glutaminsav (2,62%) tartalommal.

A hőkezelés nem okoz döntő mértékű változást a juhtej D-aminosav tartalmában, ám kísérleteinkben az aszparaginsav és a glutaminsav eltérő mértékben reagáltak a hőkezelésre. A glutaminsav D-enantiomer mennyisége a 110 °C-on történő hőkezelés hatására kétszeresére nőtt és esetében a racemizáció gyorsabb ütemű volt..

A D-aminosav tartalom minden vizsgált tejtermék esetében jelentős volt. A D-aszparaginsav 16,8-39,5%-ban, míg a D-glutaminsav 13,3%-27,0%-ban volt megtalálható a termékekben. A nyers és hőkezelt juhtejben a D-aszparaginsav aránya lényegesen nagyobb volt a D-glutaminsavhoz képest, míg a termékekben a két D-aszp./D-glu. arány közelebb került az 1,0 -hez.

A D-aszparaginsav és D-glutaminsav megállapított mennyiségének és arányának eredményei, valamint a különböző hőkezelésekből származó eredmények egyelőre nem tesznek lehetővé általános érvényű megállapításokat. További vizsgálatokra van szükség, külön a hőmérséklet és hőntartási idő, valamint az egyes kultúrák, akár egyes baktérium fajok pontos hatásainak tisztázására annak érdekében, hogy a tejtermékek D-aminosav tartalmát elfogadhatóan alacsony értéken tarthassuk.

FELHASZNÁLT IRODALOM - REFERENCES

1. BADA, J.L.(1985): Racemization of amino acids. In Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, ed. G.C.Barrett, 399-411. London-New York, Chapman & Hall.
2. BRUCKNER, H. & HAUSCH, M.(1990): D-amino acids in dairy products: Detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid curd cheese. Milchwissenschaft, 45. 357-360.
3. CSAPÓ, J. - EINARSSON, S. (1993): Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma. 1. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása az 1-/9-fluorenil/etil-kloroformáttal történő származékképzés

után fordított fázisu folyadékkromatográfiával. Élelmiszervizsgálati Közlemények . 39. 290-302.

4. CSAPÓ, J. - MARTIN, T.G. - CSAPÓ-KISS, ZS. - STEFLER, J. - NÉMETHY, S. (1995b): Influence of udder inflammation on the D-amino acid content of milk. *Journal of Dairy Science*, 78. 2375-2381.
5. CSAPÓ, J. - CSAPÓ-KISS, ZS. - STEFLER, J. (1997b): Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62. 1-2. 162-167.
6. CSAPÓ, J. - CSAPÓ-KISS, ZS. - STEFLER, J. - CSORDÁS, E. - MARTIN, T.G. - NÉMETHY, S. - WÁGNER, L. - TÁLOS, T. (1996-97): A tőgygyulladás hatása a tej D-aminosav tartalmára. *Szaktanácsok*. 1-4. 38-52.
7. FOLESTAD, S. - TIVESTEN, A. - CSAPÓ, J. (1994): Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma. 2. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása származékképzés után. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 40. 17-26.
8. GANDOLFI, I. - PALLA, G. - DELPRATO, L. - DENISCO, F. - MARCHELLI, R. - SALVADORI, C.(1992): D-amino acids in milk as related to heat treatments and bacterial activity. *J. Food Sci.*, 57. 377-379.
9. LIARDON, R. - HURRELL, R.F.(1983): Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 31. 432-437.
10. PALLA, G. - MARCHELLI, R. - DOSSENA, A. - CASNATI, G.(1989): Occurrence of D-amino acids in food. Detection by capillary gas chromatography and by reversed-phase high-performance liquid chromatography with L-phenylalaninamides as chiral selectors. *J. Chromatography*, 475. 45-53.
11. PAYAN, I.L. - CADILLA-PEREZRIOS, R. - FISHER, G.H. - MAN E.H.(1985): Analysis of problems encountered in the determination of amino acid enantiomeric ratios by gas chromatography. *Anal. Biochem.*, 149. 484-491.
12. STEINBERG, S. - BADA, J.L.(1981): Diketopiperazine formation during investigations of amino acid racemization in dipeptides. *Science*, 213. 544-545.